

**Таблица 2 - Характеристика тест-системы для обнаружения РНК вируса гепатита С**

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая РНК ВГС Плазма с ВГС	$\geq 5$ копий за пробег 50 ME/ml
Линейный диапазон	Синтетическая РНК ВГС	$> 8$ логарифмов
Частота восстановления	Синтетическая РНК ВГС	100% сверх 6 логарифмов
Распознавание генотипов	Референсные образцы	1a 1b 2a 2b 2c 2i 3a 4 5a 6
Аналитическая специфичность	Различные РНК и ДНК вирусы	100%
Диагностическая специфичность	ВГС негативная плазма	100%
Устойчивость: частота ошибок системы	ВГС плазма	0%
Эквивалентность плазмы и сыворотки	ВГС положительные образцы	100%

### **Литература:**

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 457 с.
2. The development of a qualitative real-time RT-PCR assay for the detection of hepatitis C virus / A. Clancy [et al.] // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2008. – № 27. – P. 1177–1182.
3. Pawlowsky, J. M. Molecular diagnosis of viral hepatitis / J. M. Pawlowsky // Gastroenterology. – 2002. – № 122. – P. 1554–1568.
4. ПЦР "в реальном времени"/ под ред. Д. В. Ребрикова. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

## **МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕТОД ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ХИМЕРНОГО ОНКОГЕНА BCR/ABL**

**Семенов В.М., Субботина И.А.**

УО «Витебский государственный медицинский университет»

В настоящее время установлено, что специфическим маркером хронического миелолейкоза (ХМЛ) является филадельфийская хромосома (Ph'), которая возникает в результате реципрокной транслокации t(9;22) \*1+. Практически во всех случаях ХМЛ разрыв 22-й хромосомы в гене BCR происходит в небольшом локусе M-bcr размером 5.8 т.п.н. При этом разрыв 9-й хромосомы может возникнуть в протяженной 5'-области гена ABL длиной свыше 300 т.п.н. При осуществлении транслокации t(9;22) в составе Ph'-хромосомы образуется химерный ген BCR/ABL, белковый продукт которого p210 BCR/ABL служит причиной развития хронического миелолейкоза. Необходимо отметить, что классический цитогенетический

анализ, который в большинстве случаев позволяет достоверно устанавливать диагноз ХМЛ по присутствию в анализируемом образце Ph'-хромосомы, в условиях постоянного совершенствования терапии ХМЛ становится недостаточно чувствительным для оценки минимальной остаточной болезни[1, 2, 3].

Кроме того, затруднения при стандартном цитогенетическом анализе связаны и с тем, что около 5% ХМЛ даже в начале заболевания не имеют классической Ph'-хромосомы, которая изменяется до неузнаваемости в результате сложной генетической перестройки с участием дополнительных хромосом. В тоже время, химерный онкоген BCR/ABL у таких пациентов экспрессируется и может быть выявлен методами молекулярно-биологического анализа. При этом Ph'-хромосома является генетической аномалией, наиболее полно проанализированной на молекулярном уровне, поэтому применение молекулярных методов для качественной и количественной диагностики этого маркера опирается на надежный теоретический фундамент[2].

Внедрение в начале 90-х годов XX века метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для молекулярной диагностики ХМЛ позволило более корректно разделить пациентов на группы, поскольку основным критерием для такого разделения стала не зона, в которую попадают геномные точки разрыва, а конечный результат молекулярной перестройки при t(9;22) – тип экспрессии химерного онкогена BCR/ABL. При этом стали выявлять при ХМЛ основные варианты этого онкогена b2a2 и b3a2, а также e1a2. Вскоре во многом благодаря именно этой методике были обнаружены при ХМЛ и при Ph'-положительном ОЛЛ более редко встречающиеся транскрипционные варианты химерного онкогена BCR/ABL: e1a3, b2a3, b3a3, e6a2, e19a2. Анализ интрон/экзонной структуры нормальных генов BCR и ABL позволяет выявить значительное число потенциальных соединений экзонов BCR с экзонами ABL с сохранением рамки считывания. Экзоны BCR e1, e6, e12(b1), e13(b2), e14(b3), e19(c3) и e20(c4) могут слиться «в рамку» с a2, a3 и a7 экзонами ABL (однако в месте слияния e12 и a7 должен возникнуть стоп-кодон). Некоторые из этих комбинаций действительно встречаются, а остальные теоретически возможны. Кроме того, экзоны BCR e2, e3, e4, e5, e7, e8, e10, e11, e15, e16, e17 и e22 могли бы слиться «в рамку» с экзонами ABL a4, a8, a9, a10 и a11; экзоны BCR e9 и e21 – с a5 и a6 ABL. Изучение искусственных мутантных форм BCR/ABL показало, что для проявления его трансформирующей активности необходим SH2 домен ABL, который закодирован в экзонах a3 и a4. Следовательно, маловероятно, что будут обнаружены в качестве единственного маркера Ph'-положительных заболеваний какие-либо варианты химерного гена BCR/ABL без этих экзонов[3].

К сожалению, изучение рядом лабораторий первичной последовательности нескольких десятков разных геномных точек разрыва химерного онкогена BCR/ABL от пациентов ХМЛ пока не позволило

выявить никакой характерной молекулярной структуры, общей для всех проанализированных сайтов разрыва-слияния ДНК генов BCR и ABL.

Для решения этих проблем может быть применена ПЦР-амплификация, субстратом которой является не геномная ДНК пациента, а тотальная РНК, выделенная из клеток костного мозга или периферической крови. Метод, известный как ОТ ПЦР (обратная транскрипция –полимеразная цепная реакция) достаточно прост и воспроизводим, и при этом он обладает такой высокой чувствительностью, что с его помощью можно обнаруживать одну опухолевую клетку среди 100000 –1000000 анализируемых клеток.

**Цель исследования**–разработка метода для количественного определения слияния BCR-ABL и транскриптов ДНК, содержащей (Ph+) транслокации t(9; 22) в главных критических точках кластера региона (M-BCR) b2a2 и b3a2, соответственно, в РНК или мРНК образцах, приготовленных из нативных или очищенных человеческих белых кровяных клеток, полученных из крови или костного мозга.

**Материал и методы.** Были созданы олигонуклеотидные миксты, содержащие М BCR/ABL кДНК, специфичные праймеры, стабилизированные синтетические М BCR/ABL стандарты ДНК. Отработаны параметры лиофилизации компонентов тест-системы.

**Результаты и обсуждение.** В результате работы впервые в Республики Беларусь была создана тест-система для количественного определения слияния BCR-ABL и транскриптов ДНК методом ОТ ПЦР. Характеристика созданной тест-системы представлена в таблице и рисунке.

Созданный нами метод создает возможность не только выявлять ген BCR/ABL, но и оценивать интенсивность его экспрессии, а это равносильно определению опухолевой нагрузки при ХМЛ, что крайне важно для оценки эффективности лечения и мониторинга минимальной остаточной болезни.

При помощи разработанной нами методики ОТ ПЦР в реальном времени количество транскрипта гена BCR/ABL можно оценить как абсолютно, установив количество матрицы в анализируемом образце, так и по отношению к уровню экспрессии контрольного гена ( ABL, BCR) .

**Таблица.** Характеристика тест-системы для количественного определения слияния BCR-ABL и транскриптов ДНК методом ОТ ПЦР

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая ДНК М-BCR-ABL	≥5 копий за пробег
	K562 кДНК	1 опухолевая клетка на 10 <sup>6</sup> лейкоцитов
Линейный диапазон	Синтетическая ДНК М-BCR-ABL	5 логарифмов
Диагностическая специфичность	Цитогенетика/ кДНК пациента с ХМЛ	Корреляция между уровнем Ph <sup>+</sup> и BCR-ABL транскриптами BM 0.731, p<0.001; PB 0.7684, p<0.001
Устойчивость: частота ошибок системы	K562 кДНК	0%

## Выводы

1. Созданная тест-система может быть использована для количественного определения слияния BCR-ABL и транскриптов ДНК, содержащей (Ph<sup>+</sup>) транслокации t(9; 22) в главных критических точках кластера региона (M-BCR) b2a2 и b3a2, соответственно, в РНК или мРНК образцах, приготовленных из нативных или очищенных человеческих белых кровяных клеток, полученных из крови или костного мозга путем аспирации.

2. Тест-система предназначена для мониторинга успешности терапии и в научных исследованиях для оценки влияния факторов на течение ХМЛ.

#### **Литература:**

1. Functional characterization of the promoter region of the human EVI1 gene in acute myeloid leukemia: RUNX1 and ELK1 directly regulate its transcription / M. Maicas [et al.] // *Oncogene*. – 2012 Jun 11. doi: 10.1038/onc.2012.222.

2. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia –A Europe Against Cancer Program / J. Gabert [et al.] // *Leukemia*. – 2003. – Vol. 17. – P. 2318–2357.

3. Hughes, T. Molecular monitoring of BCR–ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia / T. Hughes, S. Branford // *Blood reviews*. – 2006. – Vol. 20. – P. 29–41.

### **РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СУММАРНОЙ ОЦЕНКИ ТРАНСКРИПТОВ СУРВИВИНА**

***Семенов В.М., Шляхтунов Е.А., Поляржин В.В.,  
Субботина И.А., Пашинская Е.С., Егоров С.К.***

**УО «Витебский государственный медицинский университет**

Нарушение апоптоза, приводящее к накоплению клеток, содержащих поврежденную ДНК, дефекты митотического аппарата ведут к возникновению раковой опухоли и, в конечном счете, ее прогрессии [1]. В балансе между пролиферацией и программируемой смертью клетки основную роль играют белки семейства IAP (IAP - inhibitors of apoptosis) - белки-ингибиторы апоптоза [2]. Среди белков, ингибирующих апоптоз, ключевую роль играет сурвивин. Его экспрессию можно обнаружить в большинстве видов опухолей, в то время как в нормальных тканях она практически не детектируется. Члены семейства IAP обычно содержат несколько бакуловирусных IAP повторений (BIR) доменов. В связи с этим сурвивин, также называют бакуловирусным протеином, который у людей закодирован геном BIRC5. Экспрессия генов BIRC5 высока в период внутриутробного развития и в большинстве опухолей. Экспрессия гена сурвивина отрегулирована клеточным циклом и выражена в фазах G2-M.